



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : CI2N 15/74, 1/21	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/18164 (43) Date de publication internationale: 16 septembre 1993 (16.09.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00248 (22) Date de dépôt international: 12 mars 1993 (12.03.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/03034 13 mars 1992 (13.03.92) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 145, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : GRUSS, Alexandra [FR/FR]; 55, rue Charlot, F-75003 Paris (FR). MA-GUIN, Emmanuelle [FR/FR]; 16, avenue du Fort, F-92120 Montrouge (FR). (74) Mandataire: MARTIN, Jean-Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AU, CA, JP, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: THERMOSENSITIVE PLASMID (54) Titre: PLASMIDE THERMOSENSIBLE (57) Abstract <p>Bacterial vector plasmid of the type having an efficient replication origin in Gram-positive bacteria. Said plasmid is characterized by having at least one marker gene which expresses itself in a bacterial host strain, an efficient replication system which is thermosensitive based on a temperature compatible with the viability of the host strain, and in that the temperature of replication inhibition is below or equal to approximately 37 °C. The invention also concerns a bacteria containing said plasmid and a process for inactivating a gene in the chromosome of a bacteria.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne un plasmide vecteur bactérien du type comportant une origine de répllication efficace dans les bactéries gram positives, caractérisé en ce qui comporte au moins: un gène marqueur qui s'exprime dans une souche hôte bactérienne, un système de répllication efficace qui est thermosensible à partir d'une température compatible avec la viabilité de la souche hôte, en ce que la température d'inhibition de répllication est inférieure ou égale à environ 37 °C, ainsi qu'une bactérie le contenant et un procédé d'inactivation d'un gène présent dans le chromosome d'une bactérie.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LJ	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Allemagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
FI	Finlande				

PLASMIDE THERMOSENSIBLE

La présente invention concerne un plasmide utilisable pour la modification génétique des bactéries à coloration gram positive, en particulier des bactéries lactiques présentant un intérêt industriel ou médical.

5 Elle concerne également des bactéries contenant un tel plasmide. Elle concerne enfin des procédés de modifications génétiques mettant en oeuvre un tel plasmide, soit pour inactiver un gène normalement présent dans le chromosome bactérien, soit pour introduire et exprimer un gène d'intérêt.

10 De nombreuses bactéries gram à coloration gram positive sont des sujets d'étude comme modèle biologique (par exemple les bactéries du genre Bacillus), comme souche de fermentation d'intérêt industriel (bactéries à acide lactique) ou comme pathogène (par exemple Clostridia, Listeria, Staphylococcus, Streptococcus). Beaucoup de ces souches sont
15 caractérisées d'un point de vue physiologique mais peu ont été étudiées ou modifiées génétiquement. L'étude ou la modification des souches peut être facilitée par l'utilisation de vecteurs permettant des insertions dirigées ou non-spécifiques dans le chromosome bactérien. Des systèmes de délivrance qui sont fondés sur des vecteurs non réplicatifs sont limités aux bactéries
20 qui peuvent être transformées avec une haute fréquence et ceux utilisant des réplicons actifs uniquement sous certaines conditions sont souvent limités à leur spectre d'hôte. Aussi la construction de souches recombinantes requiert un effort important et ne peut être appliquée avec efficacité qu'à certains microorganismes spécifiques.

25 L'addition, la perte ou la modification de gènes peuvent transformer le rôle d'un organisme dans un processus industriel tel que la fermentation.

La biotechnologie cherche à faciliter l'usage industriel de microorganismes. Par exemple, les bactéries lactiques sont utilisées en
30 agroalimentaire, majoritairement pour la fabrication de produits laitiers fermentés, mais aussi en dehors de la filière lait pour la fabrication de vin, cidre, charcuterie et ensilage.

Il est donc particulièrement souhaitable de disposer de moyens efficaces d'introduire ou de modifier spécifiquement et définitivement certains gènes dans ces organismes.

Actuellement, la modification du chromosome chez les bactéries lactiques est effectuée par l'intermédiaire d'un système par transformation d'un plasmide non réplcatif. Dans une seule étape, il est nécessaire d'avoir deux évènements de basse fréquence, la transformation par un plasmide, et une recombinaison dans le chromosome. La probabilité d'obtenir ces deux évènements dans une seule étape est le produit des probabilités de chacun ; donc une chance très faible d'obtenir la modification.

Le plasmide pWV01 est un plasmide cryptique initialement isolé chez *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ; il s'agit d'un plasmide à large spécificité d'hôte, réplcatif à la fois dans des bactéries gram positif et gram négatif, notamment chez *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus* et *Lactobacillus*. Il a été caractérisé et sa séquence nucléotidique a été publiée par Leenhouts et al (1991).

Dans la demande WO 85/03495, de larges fragments de ce plasmide sont utilisés pour construire un plasmide recombinant pGK12, marqué par le gène de résistance à l'érythromycine, et/ou le gène de résistance au chloramphénicol (la chloramphénicol-acétyl-transférase (CAT)). Ce plasmide pGK12 n'est pas utilisable pour faire des intégrations dans le chromosome bactérien.

Les plasmides non réplcatifs utilisés jusqu'à présent permettent de pallier ce problème, mais ce système requiert des taux de transformation élevés pour permettre la détection d'évènements de basse fréquence tels que la transposition ou la recombinaison dans le chromosome ; or la plupart des bactéries lactiques sont faiblement transformables.

L'ensemble de ces difficultés pourrait être surmonté grâce à l'obtention d'un réplicon thermosensible, utilisable comme vecteur de livraison dans les bactéries, lactiques ou autres.

Les plasmides pE194 et PSH71 ont été décrits comme naturellement thermosensibles, au-dessus d'une température de 51° C (J. Bacteriol., 1990, 172, 4543-4548)

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un plasmide vecteur bactérien du type comportant une origine de réplication efficace dans les bactéries gram+, caractérisé en ce qu'il comporte au moins :

- un gène marqueur qui s'exprime dans une souche hôte bactérienne,
- un système de réplication efficace qui est thermosensible (Ts) à partir d'une température compatible avec la viabilité de la souche hôte,

et en ce que la température d'inhibition de réplication est inférieure ou égale à environ 37° C.

Le fait que le plasmide selon l'invention soit non réplcatif à 37° C le rend particulièrement approprié dans le cas où les bactéries ont une température de croissance relativement basse, ou lorsqu'un choc thermique important n'est pas souhaitable. Le plasmide selon l'invention est utilisable seul, il n'a pas à être associé à un autre plasmide. L'inhibition de la réplication par des températures supérieures à environ 37° C, n'est pas souche dépendante. Il possède un large spectre d'hôtes et peut s'établir notamment chez les souches classiques appartenant au groupe comprenant :

Bacillus, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, Listeria, Pediococcus, Staphylococcus, Clostridia, Leuconostoc, E. coli. Parmi celles-ci, on peut citer à titre d'exemple les espèces suivantes : B. subtilis, E. faecalis, L. fermentum, L. helveticus, L. bulgaricus, L. lactis, S. pyogenes, S. thermophilus, S. sanguis, L. monocytogenes.

Le plasmide selon l'invention porte au moins un gène codant pour un marqueur de sélection, ainsi que les éléments nécessaires à son expression tels que promoteur, site de fixation des ribosomes, terminateur, etc. Des gènes de sélection sont par exemple des gènes de résistance aux antibiotiques (Erythromycine, chloramphénicol), ou permettant la croissance sur un milieu dépourvu de certains éléments, etc.

Le gène marqueur est intégré dans le chromosome en cas de recombinaison.

Par système de répllication, on entend un système comprenant une origine de répllication ainsi que la protéine induisant son fonctionnement ; ladite protéine est inactivée au-dessus d'une température inhibant le système de répllication.

5 Un tel plasmide se réplique normalement à 28° C, chez un grand nombre de bactéries. A une température supérieure à environ 35° C, la répllication de ce plasmide est inhibée ; cette température inhibitrice de la répllication du plasmide est relativement basse et permet la multiplication et la croissance normale de la plupart des bactéries, en particulier des
15 bactéries lactiques. La température recommandée pour l'inactivation efficace de ce plasmide est de 37° C.

Selon l'un de ses aspects, la présente invention a pour objet un plasmide vecteur, caractérisé en ce qu'il contient le plus grand fragment Cla I du plasmide pWV01, présentant au moins une mutation dans la région
15 Thal-RsaI.

Plus particulièrement, un plasmide vecteur à répllication thermosensible selon l'invention présente au moins une mutation dans la région correspondant à RepA du plasmide pWV01. La protéine RepA est codée par l'un des 4 cadres ouverts de lecture (ORF) identifiés sur pWV01,
20 l'ORF A, et est nécessaire pour la répllication.

Des mutations préférées de ce plasmide se trouvent dans les positions 972, 977, 980 et 987 de la séquence nucléotidique de pWV01.

La protéine RepA codée par le plasmide selon l'invention présente, par rapport au type sauvage, les modifications représentées à la
25 figure 3, à savoir le remplacement de :

- Ser par Asn,
- Asp par Asn,
- Val par Ile,
- Arg par Gln.

30 Un tel plasmide constitue un vecteur suicide à large spécificité d'hôte, d'un type unique jusqu'à nos jours dans le domaine des bactéries lactiques.

En effet, il permet de dissocier en deux étapes, l'intégration dans le chromosome. Dans la première étape de transformation, le plasmide est établi dans la cellule. Dans la deuxième étape, l'évènement d'intégration dans le chromosome est sélectionné par élévation de la température.

5 On peut ainsi modifier génétiquement des bactéries réputées peu transformables.

Plus particulièrement, des plasmides selon l'invention comportent une des séquences représentées sur une des figures 9, 10 ou 11, ou une séquence représentant au moins 80% d'homologie avec ces
10 séquences.

Les outils génétiques ainsi développés permettent d'introduire et de stabiliser des gènes dans le chromosome bactérien.

On choisit par exemple d'appliquer un procédé par recombinaison homologue.

15 Pour cela, on utilise un réplicon thermosensible selon l'invention, qui comporte en outre au moins un fragment d'ADN homologue à l'ADN chromosomique de la bactérie que l'on veut modifier.

Selon l'un de ses aspects, la présente invention a pour objet un procédé d'inactivation d'un gène présent dans le chromosome d'une
20 bactérie, caractérisé en ce que :

- a) on introduit dans la bactérie, par transformation, le plasmide selon l'invention,
- b) on cultive la bactérie sur milieu sélectif à une température inférieure à la température d'inhibition de l'origine de réplication,
- 25 c) on élève la température de culture à une température supérieure à ladite température d'inhibition,
- d) on récupère les bactéries survivantes après plusieurs cycles de multiplication, à température d'inhibition de la réplication plasmidique.

30 L'étape d) permet de sélectionner les bactéries portant le marqueur plasmidique.

Le fragment chromosomique cloné dans le plasmide peut correspondre à un gène précis, qui est spécifiquement inactivé par intégration du plasmide au niveau de la copie chromosomique du gène. Dans la population bactérienne, seul ce site d'intégration sera trouvé.

5 Dans un autre mode de réalisation, l'ADN bactérien présent dans le plasmide pourra être choisi dans une banque de fragments chromosomiques pour le clonage, et il y aura intégration au hasard ; le site d'intégration du plasmide est différent d'une bactérie à l'autre et on réalise ainsi de la mutagénèse.

10 Le procédé peut également s'appliquer à un réplicon thermosensible porteur d'un transposon. On dispose de différents transposons pour mutagéniser le chromosome.

Le plasmide Ts est employé comme porteur d'un de ces transposons éventuellement modifié pour être actif chez *L. lactis*. Chaque
15 transposon porte un gène marqueur (ex: gène de résistance). En appliquant le protocole précédemment décrit (a à c), on obtient, des cellules ayant intégré le transposon dans leurs chromosomes. On sélectionne ces cellules au moyen du marqueur du transposon. Dans le cas de la transposition, le plasmide n'est pas intégré dans le chromosome.

20 En variante, le plasmide vecteur selon l'invention comporte également un locus de mobilisation permettant la conjugaison. De préférence, ce locus de mobilisation est le locus ori T, extrait d'un plasmide de bactérie à gram positif, préférentiellement pouvant être extrait d'un plasmide de *Streptococcus*. Le plasmide vecteur portant ce
25 locus peut être mobilisé et transféré par conjugaison chez des espèces bactériennes non transformables.

Le procédé d'inactivation d'un gène dans une bactérie fait alors intervenir les étapes suivantes :

a) on introduit dans la bactérie, par conjugaison, un plasmide selon
30 l'invention, portant un locus de mobilisation et un fragment homologue au chromosome et/ou un transposon,

- b) on cultive la bactérie sur milieu sélectif à une température inférieure à la température d'inhibition de l'origine de réplication,
- c) on élève la température de culture à une température supérieure à ladite température d'inhibition,
- 5 d) on récupère les bactéries survivantes après plusieurs cycles de multiplication, à température d'inhibition de la réplication plasmidique.

Les bactéries obtenues à l'issue de l'étape d) ont subi un événement de recombinaison ou de transposition et portent le marqueur du
10 transposon ou du plasmide.

En variante, le plasmide vecteur selon l'invention, comporte également un réplicon actif chez *E. coli*. Le plasmide vecteur portant ce locus, et ces dérivés, peut être propagé chez *E. Coli*. Les constructions préparées et propagées chez *E. coli* à 37° C (grâce au deuxième réplicon)
15 peuvent être ensuite transférées dans les bactéries lactiques dans lesquelles seul le réplicon Ts sera actif.

Dans les procédés décrits ci-dessus, après introduction du plasmide vecteur dans la bactérie par transformation ou conjugaison à l'étape a), on laisse le plasmide s'établir dans la population bactérienne,
20 par réplication, à 28-30° C.

Le caractère de sélection est exprimé dans l'ensemble des bactéries. Quand la température s'élève au-dessus de 35° C, le plasmide sous forme libre devient incapable de se répliquer et se trouve donc perdu lors des divisions cellulaires. Seules les bactéries pour lesquelles ce
25 plasmide s'est intégré par recombinaison dans le chromosome ou pour lesquelles le transposon s'est intégré dans le chromosome, conservent et transmettent l'information génétique portée par le plasmide ou le transposon et leur permettant de pousser sur milieu sélectif. On sélectionne ainsi les événements d'intégration, de basse fréquence, en récupérant les
30 bactéries se multipliant à 35-37° C sur milieu sélectif.

Lorsque le plasmide est intégré dans le chromosome, il présente une excellente stabilité, qui peut être de l'ordre de 99% après 75 générations à 37,5° C.

5 Le schéma suivi pour l'intégration du plasmide par recombinaison homologue est illustré à la figure 6.

La souche L. lactis VE 6002, contenant le plasmide pVE6002 selon l'invention a été déposée à la collection nationale de l'Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, Paris, sous le numéro I-1179.

15 Selon un autre de ses aspects, l'invention a pour objet un procédé permettant l'introduction d'un gène hétérologue dans une bactérie. Pour sa mise en oeuvre, on utilise un plasmide vecteur thermosensible tel qu'il a pu être défini précédemment, et comportant en outre un gène codant pour une protéine d'intérêt, sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression, et qui sont connus de l'homme du métier. Le
15 cas échéant, ce gène pourra être porté par le transposon. On suit alors les étapes indiquées ci-après.

- a) on introduit dans la bactérie, par transformation ou conjugaison un plasmide selon l'invention,
- b) on cultive la bactérie sur milieu sélectif à une température inférieure
20 à la température d'inhibition de l'origine de répllication,
- c) on élève la température de culture à une température supérieure à ladite température d'inhibition,
- d) on récupère les bactéries survivantes après plusieurs cycles de multiplication, à température d'inhibition de la répllication plasmidique.
25

L'étape d) permet de sélectionner les bactéries portant le marqueur du plasmide ou du transposon.

L'invention a également pour objet des bactéries contenant un plasmide selon l'invention, sous forme libre ou intégrée dans le chromo-
30 some.

De telles bactéries trouveront notamment des applications dans le domaine de l'industrie agroalimentaire, en particulier laitière, ou fromagère.

Dans certains des cas décrits précédemment, on souhaite pouvoir éliminer tout ou une partie du matériel génétique introduit dans le chromosome bactérien par le procédé selon l'invention.

Le procédé de recombinaison homologue permet deux étapes :

- 5 la première consiste à sélectionner l'évènement d'intégration du plasmide, la seconde étape - qui est facultative - consiste à exciser du chromosome le réplicon et les marqueurs qui ne correspondent pas aux normes alimentaires.

Excision du réplicon : l'intégration par recombinaison
10 homologue crée des duplications de chaque côté du plasmide Ts (Fig. 7a). Il a été montré qu'un plasmide rolling-circle, répliatif intégré dans le chromosome stimule fortement la recombinaison homologue entre les séquences avoisinantes. Lorsque le fragment chromosomique porté par le plasmide Ts contient un marqueur, les duplications créées par l'intégration
15 permettent d'exciser le réplicon en laissant un gène chromosomique inactif (Fig. 7a). Expérimentalement, il s'agit de cultiver à 28° C la souche contenant le plasmide intégré (préalablement sélectionnée à 37° C). A température permissive, la réplication reprend et stimule la recombinaison entre les séquences répétées aboutissant à la délétion du réplicon (Fig. 7a).

20 La présente invention a également pour objet un plasmide vecteur à réplication thermosensible présentant une ou plusieurs des caractéristiques déjà exposées, et dans lequel une région interne est dupliquée. Les deux séquences identiques sont placées de manière à encadrer la région que l'on souhaite éliminer. Un tel plasmide est alors
25 utilisé dans un procédé d'inactivation d'un gène ou d'introduction d'un gène hétérologue par recombinaison dans le chromosome bactérien, tels que décrits ci-dessus.

A l'issue de l'étape d), les bactéries survivantes sont à nouveau
30 mises en culture à une température inférieure à la température d'inhibition, par exemple à 28-30° C, sur milieu non sélectif. En effet, un plasmide répliatif stimule fortement la recombinaison homologue entre les

séquences avoisinantes. La souche contenant le plasmide intégré préalablement sélectionnée à 35-37° C est cultivée à température permissive : la réplication plasmidique reprend, stimulant la recombinaison entre les séquences répétées. Le réplicon et les marqueurs incompatibles avec, par exemple, une utilisation agroalimentaire de ce système, sont excisés, avec rétention éventuelle du gène modifié. La sélection des bactéries ayant excisé les marqueurs indésirables se fait après étalement à température non-permissive. Ce mécanisme est illustré sur la figure 7b.

Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

On se référera aux figures suivantes :

FIGURE 1 : cinétique de perte et analyse du nombre de copies de pVE6002 selon l'invention et de pVE6001 non Ts. *L. lactis* subsp. *lactis* IL 1403 portant le plasmide pGK12, pVE6001 ou pVE6002 sont cultivés à 28° C ou 37,5° C. Après différents temps de culture, des échantillons sont prélevés pour être cultivés à 28° C sur des milieux sélectifs et non-sélectifs. 100 colonies sont repiquées à partir du milieu non-sélectif sur le milieu sélectif (Em 5 µg/ml) pour évaluer la proportion de cellules contenant un plasmide dans la population. Les extractions d'ADN total sont faites sur les cultures à 28° C ou 37,5° C, sans sélection, pendant 5h 30.

FIGURE 2 : Plasmide hybride de pGK12 et pVE6002. pVE6043 est constitué du fragment SacI-Thal, de 994 pb, de pGK12, lié au fragment Thal-SacI de 3384 pb de pVE6002. pVE6044 contient la paire réciproque, le fragment SacI-Thal de 994 pb de pVE6002, lié au fragment Thal-SacI de 3384 pb de pGK12. Les traits fins correspondent à l'ADN de pGK12 ; les traits épais pointillés, à l'ADN de pVE6002.

FIGURE 3 : Localisation de la mutation Ts dans le gène RepA de pVE6002. Le fragment Thal-RsaI de pVE6002, contenant le gène RepA a été séquencé sur les deux brins. La séquence montre quatre mutations aux positions 972, 977, 980, 987, alors que le reste de la séquence ne diffère pas de la séquence publiée pour le réplicon parental pWV01.

FIGURE 4 : Description des dérivés thermosensibles. pVE6006 est construit par insertion du fragment PvuII de 445 pb de pBluescript SK+ dans le site ClaI de pVE6002.

pVE6007 provient d'une délétion SacI de pVE6006, conduisant à la perte du gène de résistance à l'érythromycine. pVE6004 est construit par insertion du fragment PvuII de 445 pb de pBluescript SK+ dans le fragment ClaI-HpaII de pVE6002 dépourvu de gène de résistance au chloramphénicol.

FIGURE 5 : Comparaison des protéines analogues à Rep de PE.194.

FIGURE 6 : Schéma du procédé d'inactivation d'un gène.

FIGURE 7a : Schéma d'un exemple d'excision du réplicon Ts en deux étapes.

7b : Schéma de l'excision du réplicon au moyen de duplications plasmidiques.

FIGURE 8 : Construction des plasmides pG⁺host5 et pG⁺host6 à partir du plasmide pG⁺host4 (ou pVE6004) : le plasmide pG⁺host5 est construit par insertion du fragment Ava I - Alw N I de pBR 322 (qui contient l'origine de répllication de pBR 322) dans le pG⁺host4 linéarisé par Nsi I.

pG⁺host6 est construit par insertion du fragment Ava I - Eco R I de pBR 322 (qui contient l'origine de répllication de pBR 322 et le gène de résistance à l'ampicilline) dans le pG⁺host4 linéarisé par Nsi I.

FIGURE 9 : Séquence nucléotidique de pG⁺host4.

FIGURE 10 : Séquence nucléotidique de pG⁺host5.

FIGURE 11 : Séquence nucléotidique de pG⁺host6.

Exemple 1 : Préparation et caractérisation d'un plasmide vecteur
thermosensible

5 MATERIELS ET METHODES

Les travaux ont été réalisés au Laboratoire de Génétique Microbienne, Institut de Biotechnologie, INRA, 78352 Jouy-en-Josas cedex France.

10

Souches bactériennes, plasmides et conditions de culture.

Les plasmides et les souches bactériennes utilisées sont indiqués dans le tableau 1. Les constructions de pVE6043 et pVE6044 sont décrites dans la figure 2 ; les plasmides pVE6004, pEV6006 et pVE6007 sont
15 présentés à la figure 4. pVE6004 (ou pG⁺host4) est construit par insertion d'un fragment d'ADN PvuII de 445 pb dans le fragment ClaI-HpaII de 3340 pb à extrémité franche de l'isolat Ts original, dépourvu du gène de résistance Cm. Le fragment PvuII de 445 pb contient un site de
20 multiclonaage, les promoteurs T7 et T3, et les sites pour M13 - 20, T7, T3 et des amorces inverses qui permettent le séquençage direct à partir du vecteur. Ce plasmide est thermosensible dans tous les hôtes testés, y compris chez E. coli et doit être maintenu à 28° C.

E. coli et Bacillus subtilis ont été cultivés en milieu LB. L. lactis subsp. lactis (L. lactis) est cultivé sur milieu M17, dans lequel on a
25 remplacé le lactose par du glucose. On a utilisé respectivement du chloramphénicol (Cm) à 5 µg/ml pour L. lactis et B. subtilis et de l'érythromycine (Em) à 5 µg/ml et 0,5 µg/ml respectivement. Le Cm, l'azaserine et l'érythromycine ont été utilisés à des concentrations finales respectives de 15 µg/ml, 100 µg/ml et 150 µg/ml pour E. coli.

30

35

Clonage moléculaire, compétence et procédure de transformation.

Des enzymes du commerce ont été utilisées comme indiqué par les fournisseurs. Des mini-lysats de cellules entières et du DNA plasmidique ont été préparés ainsi qu'il est décrit dans la littérature. L'induction de compétence et la transformation d'E. coli et de B. subtilis ont été effectuées par des procédures standards (Hanahan, 1985, ou Niaudet et al, 1979). Les souches de L. lactis ont été électrotransformées comme décrit par Langella et Chopin, 1989a et modifié selon la procédure de Holo et Nes, 1989.

